

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 21 日現在

機関番号：35307

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460165

研究課題名(和文)テトラスパニンCD81を標的とする低分子型新規次世代リウマチ治療薬の開発

研究課題名(英文)Development of novel therapeutic compounds for rheumatoid arthritis targeting CD81

研究代表者

中西 徹(Nakanishi, Tohru)

就実大学・薬学部・教授

研究者番号：30243463

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：4回膜貫通型タンパク質テトラスパニンであるCD81を標的とする低分子型新規次世代リウマチ治療薬開発のため低分子化合物のスクリーニングを行った。最初にCD81分子を細胞表面に発現するSW982細胞を用いて結合試験によるスクリーニングを行った。抗CD81モノクローナル抗体と化合物を添加したところ、この抗体の結合を大きく上昇あるいは減少させる化合物が8種存在した。そこで次にこれらの化合物についてSW982細胞における炎症性サイトカインやリウマチ因子のシノビオリンの発現を減少させることを指標に2次スクリーニングを行った。その結果3種の化合物を選択した。

研究成果の概要(英文)：Screening of low MW compounds was performed for development of novel therapeutic compounds toward the treatment of rheumatoid arthritis targeting CD81, tetraspanin molecule. At first, cell binding screening was performed using SW982 cells. When anti-CD81 monoclonal antibodies and the compounds were added to cells, eight compounds were found to increase or decrease the binding of antibodies. Among them, three compounds were effective to decrease the expression of inflammatory cytokines and synoviolin.

研究分野：生化学・分子生物学

キーワード：関節リウマチ テトラスパニン CD81 シノビオリン 炎症性サイトカイン 滑膜細胞

1. 研究開始当初の背景

クラスター分化抗原 CD81 は TAPA-1 とも呼ばれ、22-26kDa の 4 回膜貫通型分子テトラスパニンファミリーの一つである。我々は以前より、リウマチ性疾患の原因因子や診断マーカーの探索研究を進めてきたが、ヒト型高密度 DNA チップを用いた変形性関節症 (OA) 滑膜細胞と関節リウマチ (RA) 滑膜細胞の遺伝子発現比較において、RA で発現亢進する遺伝子群の中にこの CD81 を見出した。さらにヒト滑膜由来滑膜肉腫細胞株である SW982 を用いて、RA における滑膜細胞の異常増殖を引き起こす原因遺伝子と考えられているシノビオリン遺伝子の発現を直接促進する可能性のある因子として初めて CD81 を同定した。そこで、この分子を標的とした根絶的リウマチ治療薬開発の可能性について検討を進め、リウマチモデル動物を用いた実験で、この分子の発現を siRNA で抑制するとリウマチの症状が大幅に改善されるという画期的発見に至った。このように CD81 を標的とする創薬が、現在、対症療法に終始しているリウマチ性疾患の新たな根絶的治療薬開発につながる可能性があるため、我々は、CD81 の細胞外領域を組換えタンパク質として大量発現し、これを抗原とすることで抗 CD81 モノクローナル抗体の樹立を行ってこれを用いたモデル動物の治療実験に進めて一定の治療効果を得るに至った。こうして CD81 を標的とするリウマチ治療用抗体医薬品開発に一定の道筋を付けることに成功した。

2. 研究の目的

上記のように、モデル動物を用いた実験において、CD81 分子の発現を siRNA で抑制するとリウマチの症状が大幅に改善された。また、CD81 の細胞外領域を大腸菌で大量発現してこれを抗原として抗 CD81 モノクローナル抗体の樹立を行い、これを用いたリウマチモデル動物の治療実験を行ったところ、同等の治療成績を得るに至った。これらの画期的成果をさらに広範な適用が可能な一般的治療法として発展させるために、今回、CD81 を標的とした低分子型新規次世代リウマチ治療薬の開発に着手した。今回、CD81 に結合してこれを阻害する低分子化合物をスクリーニングにより探索することで、リウマチ治療において、first choice として広く用いることが可能な画期的な新薬を開発することを目的としている。また、このようなステップで見いだされたリード化合物について、モデル動物を用いた治療

実験を行い、リウマチ治療効果と副作用について検証し、将来的に必要な応じてさらに化合物の modification を行って、より高活性で低副作用の化合物の開発を進めることも視野に入れている。

3. 研究の方法

上記で樹立した抗 CD81 モノクローナル抗体と CD81 を発現する SW982 細胞を用いて一次スクリーニング系を構築した。すなわち、固定化した SW982 細胞と抗 CD81 モノクローナル抗体を液相で結合させ、二次抗体 (抗マウス抗体) でこの結合物を検出するが、この際、スクリーニングしたい低分子化合物を少量添加して、抗原抗体結合物形成への阻害効果の有無を判定する。この反応は 96well のプレートを用いて行い、二次抗体を添加して形成される免疫複合体は、酵素反応により検出する。約 1,300 種類の低分子化合物ライブラリーは、連携研究者である、慶應大学薬学部 水島 徹教授と LTT ファーマより提供を受けた。CD81 機能阻害型低分子化合物を選別する二次スクリーニングは以下のように行った。TNF が CD81 を介して滑膜細胞内シノビオリンの発現を誘導することや、CD81 が滑膜細胞における TNF の産生自体を制御していることを明らかにした結果を利用して、低分子化合物が滑膜細胞における TNF の産生を抑制することや、TNF 誘導性のシノビオリン発現上昇を抑制することを指標に選別を行った。

4. 研究成果

まず 4 回細胞膜貫通型テトラスパニン CD81 を標的とする低分子型新規次世代リウマチ治療薬を開発するための一次スクリーニング系の検討を行った。まず CD81 分子を細胞表面に発現する SW982 細胞を用いて結合試験に関するスクリーニング系の検討を進めることとし、既に樹立した抗 CD81 モノクローナル抗体を、固定化した SW982 細胞に結合させてさらに別の抗 CD81 モノクローナル抗体をこれに作用させたところ、抗体によっては最初に結合した抗体の結合を上昇させたり減少させたりすることがわかった。そこでこの系を低分子化合物のスクリーニング系に適用し、実際に抗 CD81 モノクローナル抗体と低分子化合物を添加してモノクローナル抗体の結合率を調べたところ、化合物の種類によって抗体の結合率が上昇したり減少したりした。上昇する場合、結合率が 200%以上変化するもの

があり、減少する場合、結合率が 50%以上減少するものがあった。これは化合物が CD81 に結合することで、抗体の結合を修飾しているものと考えられた。特に減少する場合に化合物が細胞にダメージを与えていないことを確認した上で、結合率が 200%以上上昇したものと 50%以上減少したものを選別して、これらの化合物について作用の容量依存性を確認した。その結果、ほとんどの検体はこれらの作用に容量依存性を示していたが、最大の効果を示す容量は検体によって異なっていた。この系を用いて 1000 個以上の化合物のスクリーニングを行った結果、結合率が 200%以上上昇した化合物と 50%以上減少した化合物合計 8 個を選別した。次に、これらについて機能試験を行う二次スクリーニングを実施した。まず機能試験について予備検討を行った。機能試験には炎症性サイトカインの発現とリウマチ因子シノビオリンの発現を指標に用いることとした。最初に、SW982 細胞に抗 CD81 モノクローナル抗体を添加すると、TNF やシノビオリンの発現が減少することを定量 PCR にて確認した。次に抗体の代わりに化合物を添加すると、同じように TNF やシノビオリンの発現を変化させるものが存在した。そこで上記、一次スクリーニングで選別した 8 個の化合物についてこのスクリーニングを実施したところ、この中の 3 個について、定量 PCR によりシノビオリンの発現を抑制する効果が認められた。しかし、これらの中には TNF の発現に対しては抑制的に働くものや促進的に働くものがあった。また、これら 3 個の化合物は、いずれも容量依存的に SW982 細胞の増殖を抑制する効果を有していたが、他の CD81 非発現細胞には影響を及ぼさなかったことから、CD81 分子を介して増殖に影響を与えているものと考えられた。現在、この 3 個のうち、TNF とシノビオリンの発現の両方を減少させるものについて、リウマチモデル動物への投与、治療実験を行うべく予備試験を行っている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 5 件)

1 中西 徹、山崎 勤、新井祐志、中川周士、久保俊一 テトラスパニン CD81 を標的とする新規次世代リウマチ治療薬の開発 アレルギーの臨床 36, 1382-1387, 2016

2 Fujimoto E, Matsushita U, Nakajima T, Yagishita N, Yamasaki T, Nakanishi T. CD81 mediated regulation of synoviolin expression in synovial sarcoma cells. J Hard Tissue Biol. 25, 377-382, 2016

3 Hatanaka S, Mihara H, Kohno S, Fujimoto E, Tanaka M, Nakanishi T. Establishment of sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) system for quantitation of CCD81. J Hard Tissue Biol 24, 401-404, 2015

4 Fujita H, Yamamoto M, Ogino T, Kobuchi H, Ohmoto N, Aoyama E, Oka T, Nakanishi T, Inoue K, Sasaki J. Necrotic and apoptotic cells serve as nuclei for calcification on osteoblastic differentiation of human mesenchymal stem cells in vitro. Cell Biochem Funct 32, 77-86, 2014

5 Fujimoto H, Mori H, Takehara M, Tanaka M, Ohashi T, Ninomiya Y, Nakanishi T. Establishment of a monoclonal antibody against CD81 that decrease the proliferation of rat glioma cells. J Hard Tissue Biol 23, 131-134, 2014

〔学会発表〕(計 1 件)

1 三島 遥、山崎 勤、秋山勝紀、秋山亮子、田中美幸、藤本恵利香、中西 徹 抗 CD81 モノクローナル抗体を用いたリウマチ診断用サンドイッチ ELISA の確立 日本薬学会第 137 年会 2017.3.24-3.27 仙台

〔図書〕(計 1 件)

1 中西 徹、山崎 勤、新井祐志、中川周士、久保俊一 別冊 BIO Clinica 慢性炎症と疾患 北隆館 168 頁 2016

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中西 徹 (NAKANISHI, Tohru)
就実大学・大学院医療薬学研究科・教授
研究者番号：30243463

(2) 研究分担者

渡辺雅彦 (WATANABE, Masahiko)
就実大学・薬学部・教授
研究者番号：00182949

山川直樹 (YAMAKAWA, Naoki)
就実大学・薬学部・講師
研究者番号：20583040

新井祐志 (ARAU, Yuji)
京都府立医科大学・医学部・准教授
研究者番号：50347449

長塚 仁 (NAGATSUKA, Hitoshi)
岡山大学・大学院医歯薬総合研究科・教授
研究者番号：70237535